

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

FRANCIELI SILVA VUOLO

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM SORO E O PAPEL
DO TRATAMENTO COM CANABIDIOL EM MODELO ANIMAL
DE ASMA

CRICIÚMA, MARÇO DE 2012

FRANCIELI SILVA VUOLO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM SORO E O PAPEL
DO TRATAMENTO COM CANABIDIOL EM MODELO ANIMAL
DE ASMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA, MARÇO DE 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V994a Vuolo, Francieli Silva.

Avaliação dos níveis de citocinas em soro e o papel do tratamento com canabidiol em modelo animal de asma. / orientador: Felipe Dal Pizzol. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

66 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Asma. 2. Asma - Tratamento. 3. Canabinóides.
I. Título.

CDD. 22^a ed. 616.238

Bibliotecária Eliziane de Lucca – CRB 1101/14^a –

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata **Francieli Silva Vuolo** sob o título “Avaliação dos níveis de citocinas em soro e o papel do tratamento com canabidiol em modelo animal de asma” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.


Após haver analisado o referido trabalho e argüido à candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.


Criciúma, SC, 30 de março de 2012


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Membro Relator


Prof. Dra. Daniele Guilhermano Machado
Membro Interno


Prof. Dr. Guillian Leipnitz
Membro Externo


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Dedico esta dissertação a minha irmã
Katriny, que sempre será merecedora de
todas minhas conquistas, e a minha amiga
Fabricia, exemplo de vida, inteligência e
dedicação, que sempre me estimulou a dar
esse grande passo.

A vocês dedico esse trabalho.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente ao meu orientador, Prof. Dr. *Felipe Dal Pizzol*, grande sábio, cujas lições exploraram o ambiente acadêmico, agradeço profundamente o privilégio da boa convivência de vários anos, a personificação de uma vida dedicada à ciência e ao conhecimento e, acima de tudo, para mim, o exemplo científico e de caráter a ser seguido, respeitado e admirado;

Agradeço a minha mãe *Susana*, e ao meu pai, *Francisco*, a estes minha eterna gratidão, pessoas com muita sabedoria, que com total dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória;

À *Katriny* minha irmã, fonte de inspiração, quem sempre me conforta com sua presença, minha eterna incentivadora, companheira e amiga;

A minha avó, *Custódia*, quem me ensina os degraus que devo subir para se ter uma base sólida;

À *Fabricia*, que sempre esteve ao meu lado em todos os sentidos, meu muito obrigado;

Ao *Leonardo*, que nesta trajetória, soube compreender como ninguém a fase pela qual eu estava passando, pelas palavras de apoio, solicitude e encorajamento, e acompanhando de perto toda essa trajetória;

Às minhas amigas, em quem sempre encontro o conforto que preciso em qualquer que seja a ocasião e qualquer que seja a distancia se fazem presentes, *Fabíola* (minha estrelinha), e *Francine* (minha outra metade de Fran);

À minha amiga, *Eda Luiza* por ser sempre minha fiel ouvinte e conselheira, e pela paciência de passar comigo os últimos momentos de construção deste trabalho;

Ao meu amigo Douglas, que durante toda a trajetória de vida acadêmica esteve ao meu lado, dividindo os bons e maus momentos, e por ter enriquecido minha formação;

À todas *Pizzoteles*, em especial a *Larissa*, companheira de longos experimentos, quem muito me ensinou desde a iniciação científica, e continua ensinando, obrigada pela paciência, e a *Cristiane* (Loira), a essa dupla imbatível meu muito obrigado! A *Dhébora* pelas palavras e tão grande ajuda em pouco tempo de convivência, às alunas de IC's *Letícia* e *Renata* pela disponibilidade inconstante durante os experimentos e a amizade;

À Equipe do laboratório de bioenergética, ao Prof. *Emílio*, *Gabriela*, *Giseli*, *Isabela*, *Camila*, e *Cinara* pelo convívio, cada um com suas características particulares, e que participaram com grande contribuição na construção do que sou hoje;

A Prof.^a *Patrícia* pelo privilegio de conviver com seus sorrisos sublimes, tornando os dias mais doces;

A Universidade do Extremo Sul Catarinense, a seus funcionários e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, por me acolherem tão bem durante esses anos;

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é

decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, a meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão;

E por fim meu maior agradecimento, a Deus, que em sua infinita sabedoria, me proporcionou capacidade de recomeçar sempre, acreditando em cada novo dia.

A todos vocês muito obrigada!

"Equilíbrio é a habilidade de olhar para a vida a partir de uma perspectiva clara, fazer a coisa certa no momento certo.

Uma pessoa equilibrada será capaz de apreciar a beleza e o significado de cada situação seja ela adversa ou favorável.

Equilíbrio é a habilidade de aprender com a situação e de prosseguir com sentimentos positivos. É estar sempre alerta, ser totalmente focado, e ter uma visão ampla.

Equilíbrio vem do entendimento, humildade e tolerância. O mais elevado estado de equilíbrio é voar livre de tudo e, ainda assim, manter-se firmemente enraizado na realidade do mundo".

Brahma Kumaris

RESUMO

A asma representa um problema de saúde pública, e tradicionalmente é classificada como uma doença atópica, onde o contato ao alérgeno pode desencadear sinais clínicos como inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e obstrução reversível do fluxo aéreo. Após a instalação do processo inflamatório característico da asma, ocorre a migração de células inflamatórias para o pulmão e vias aéreas, estudos demonstram a presença de Linfócitos T auxiliar no pulmão de pacientes com asma, estas células estão envolvidas na produção de citocinas que regulam a síntese de imunoglobulinas como a IgE. Sabendo que a interação de células do sistema imune e contato com antígenos representam um ponto crucial na fisiopatologia de doenças inflamatórias, o propósito do presente estudo é avaliar o potencial antiinflamatório do Canabidiol (CBD) neste cenário, por já ter sido relatado o seu papel como efeito anticonvulsivante, antiinflamatório, sedativo, imunomodulador, analgésico e antioxidante. Para tal avaliação, utilizamos Ratos Wistar com 8 semanas de vida, e estes foram imunizados com OVA (Ovalbumina) (10mg/kg), após 14 dias foram novamente imunizados com a mesma dose, ao passar 7 dias os animais foram submetidos a 30 minutos de nebulização por 3 dias seguidos com OVA (1%). Os animais do grupo controle foram imunizados com 100 µl hidróxido de alumínio nos mesmos dias, e submetidos à nebulização somente com salina. Nos dois últimos dias de nebulização os animais receberam por via intraperitoneal o tratamento com Canabidiol na dose de 5mg/kg, e após 24 horas da última sessão de inalação, os animais foram mortos por decapitação, e o sangue foi coletado para análise de citocinas no soro. Foram determinados os níveis de IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10, e TNF- α , e os resultados se apresentaram significativamente menores quando utilizamos o CBD como tratamento, comparado aos animais que receberam somente salina como tratamento, exceto para os níveis de IL-10. Diante de toda exacerbação inflamatória encontrada durante a asma, muitos estudos apostam na modulação de ativação de citocinas como um potencial terapêutico. O CBD demonstrou ser um candidato promissor em controlar a resposta inflamatória na asma.

Palavras-Chaves: Asma, Interleucinas, Ovalbumina, Canabidiol

Abstract

Asthma represents a public health problem and, traditionally is classified as an atypical, where contacting the allergen can initiate clinical signs like airway inflammation, bronchial hyperresponsiveness and reversible obstruction of airways. After installation of the inflammatory process characteristic of asthma, occurs the migration of inflammatory cells to the lung and airways. Studies have demonstrated presence of T-Helper 2 lymphocytes in the lung of patients with asthma, as known, this cells are involved in cytokine production that regulates immunoglobins synthesis like IgE. Knowing that interaction of immune system cells and allergen contact represents a crucial point in inflammatory diseases physiopathology, the aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory potential of cannabidiol (CBD) in this setting, because it's already known antiseizure, anti-inflammatory, sedative, immunomodulatory, analgesic and antioxidant effects. For this evaluation, we used 8 week old wistar rats, that were immunized with ovalbumin (OVA) (10mg/kg), 14 days after they were immunized again (OVA, 10mg/kg), after 7 days, animals were submitted to 30 minute nebulization, for 3 consecutive days using OVA 1%. Control group animals were immunized with 100µL aluminum hydroxide in the same days, and were submitted to nebulization only with saline. In the last 2 days of nebulization animals received intraperitoneally the CBD treatment, 5mg/kg, and after 24 hours of the last inhalation session, animals were decapitated and the blood was collected to cytokine analysis using serum. Levels of IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10 and TNF- α were determinate, and the results achieved were significantly lower when CBD was used as treatment, compared to animals who only received saline as treatment, except for the IL-10 levels. Against of the inflammatory exacerbation found during asthma, many studies believe in the modulation of cytokine activation as having therapeutic potential. CBD demonstrated being an promising substance to control inflammatory response on asthma.

Key-words: Asthma, interleukin, ovalbumin, cannabidiol.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBD– Canabidiol

Fc- proteína receptora presente na superfície das células

GM-CSF- Fator estimulador de colônias de macrófagos

IgE- Imunoglobulina E

IL-10- Interleucina 10

IL-13- Interleucina 13

IL-25- Interleucina 25

IL-4- Interleucina 4

IL-5- Interleucina 5

IL-6- Interleucina 6

IL-9- Interleucina 9

LTB4- Leucotrieno B4

mRNA- RNA Mensageiro (RNA- ácido ribonucleico)

OVA- Ovalbumina

Th₂- Linfócito T Auxiliar

TNF- α - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos epidemiológicos da asma	11
1.2 Definição e Fisiopatologia	13
1.3 Modelo animal na asma.....	18
1.4 Fármacos para o tratamento da asma.....	19
1.5 Canabinóides	20
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. ARTIGO CIENTÍFICO	25
4. DISCUSSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	54

1 Introdução

1.1 Aspectos epidemiológicos da asma

A asma é um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Indivíduos de todas as idades em todos os continentes e países são afetados por essa doença crônica das vias aéreas, que quando não controlada pode interferir diretamente nas atividades de vida diária, limitar a qualidade de vida, podendo inclusive ser fatal. Há uma estimativa que a asma afete cerca de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo (Global Initiative for Asthma, 2009).

A crescente preocupação com as doenças respiratórias foi formalizada no Fórum da Sociedade Internacional de Respiração, que declarou 2010 como o “Ano do Pulmão”, com o objetivo de enfatizar a pesquisa, a conscientização da população e fomentar políticas públicas a respeito das doenças respiratórias. No Brasil, estima-se que a prevalência da asma seja em torno de 10%, atingindo cerca de 16 milhões de pessoas de todas as idades. Estudo realizado nas cidades de Recife, Salvador, Itabira, Uberlândia, São Paulo, Curitiba e Porto Alegre concluiu que 13,3% das crianças na faixa etária de 6 a 7 anos e 13 a 14 anos eram asmáticas. Em 2008 a asma foi a terceira causa de internação pelo SUS (Sistema Único de Saúde), conforme dados do DATASUS (Departamento de Informática do SUS), com cerca de 300 mil hospitalizações ao ano (Datusus, 2008), e desde de 2006 o país é considerado o 8º no mundo em prevalência de asma (Sole et al., 2006). Sole e colaboradores em 2006 estimaram uma porcentagem de 24% e 19%, entre

crianças e adolescentes, respectivamente, possuem sintomas indicativos de asma (Sole et al., 2006).

Apesar de serem apenas 5-10% dos casos, pacientes com asma grave apresentam maior morbimortalidade relativa e são responsáveis por um consumo desproporcionalmente alto dos recursos de saúde em relação aos grupos de menor gravidade. Portadores de asma grave não controlada procuram 15 vezes mais as unidades de emergência médica e são hospitalizados 20 vezes mais do que os asmáticos moderados (Serra-Batlles et al., 1998; Jardim Jr, 2007; Ponte et al., 2007).

1.2 Definição e Fisiopatologia

A asma alérgica é uma doença inflamatória complexa caracterizada pela dificuldade na ventilação das vias aéreas superiores que espontaneamente se contraem muito ou são obstruídas facilmente em resposta a uma grande variedade de estímulos. O termo asma não se refere a um único tipo de desordem orgânica, mas sim a um grande grupo de patologias que têm características fenotípicas em comum, tais como obstrução reversível das vias aéreas e sintomas associados (Holgate, 2008). As diferentes manifestações clínicas de asma envolvem vários fatores ambientais que interagem com as vias aéreas causando inflamação aguda e/ou crônica. Sendo assim, a asma é considerada um bom exemplo de interação entre fatores genéticos e ambientais, embora um único gene ou condição ambiental específica sejam *per si* incapazes de causar a doença (Beasley et al., 2001; Abbas et al., 2007).

Como a asma é uma doença heterogênea iniciada por uma variedade de agentes, não há um esquema de classificação universalmente aceito. Cerca de 70% dos casos são ditos como “extrínsecos” ou “atópicos” e são causados por respostas imunes mediadas pelo IgE (Imunoglobulina E) e Th₂ (Linfócito T auxiliar) a antígenos ambientais. Nos 30% restantes dos pacientes, a asma é dita como “intrínseca” ou “não-atópica” e é iniciada por estímulos não-imunológicos como a aspirina; infecções pulmonares, especialmente aquelas causadas por vírus; resfriados; estresse psicológico; exercício; e irritantes inalatórios. Esta distinção é útil do ponto de vista fisiopatológico, na clínica prática nem sempre é possível classificar a asma (Robbins, 2008).

Uma característica fundamental da asma é a capacidade das vias aéreas para reconhecer comuns alérgenos ambientais e gerar uma resposta de citocinas Th₂ a eles, onde a exposição continuada a alérgenos pode resultar em sinais clínicos da doença como: inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica, e obstrução reversível do fluxo aéreo. Pesquisadores chamam a atenção para o fato de que 40% da população é atópica (isto é, têm elevado IgE a alérgenos ambientais comuns), mas apenas 7% expressam sua atopia sob a forma de asma (Beasley et al., 2001).

Existem evidências de que o diagnóstico recente de pacientes asmáticos sugere que o processo inflamatório possui papel fundamental na fisiopatologia da asma (Laitinen et al., 1993; Stumbles et al., 1998). A literatura ainda evidencia, seja em estudos experimentais ou humanos, que o processo inflamatório da asma não se restringe às grandes vias aéreas, sendo possível observá-la nas vias aéreas pequenas (Balzar et al., 2002; Tulic, Hamid, 2003),

no parênquima pulmonar (Xisto et al., 2005; Lancas et al., 2006) e nos vasos pulmonares (Sur et al., 1999, Singh et al., 2005).

Um distúrbio crônico das vias aéreas constitui-se de complexas interações entre mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, neutrófilos, células epiteliais e mediadores inflamatórios (Gina, 2006). Esta inflamação e suas consequentes mudanças estruturais nas vias aéreas contribuem para a obstrução das vias aéreas e aumento da hiperresponsividade brônquica. Após uma variedade de estímulos, pacientes asmáticos podem apresentar episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, os quais são comumente observados à noite e ao despertar, já que associados às variações circadianas hormonais e/ou chegada e permanência no ambiente gatilho para a crise têm sido teorizados para explicar a intensificação da asma nesses períodos do dia (Djukanovic et al., 1990; Warman et al., 2001; Hargreave, Nair 2009).

Contudo, para se desenvolver um quadro asmático é necessário que, primeiramente haja a sensibilização a algum antígeno (Fig. 1), uma característica fundamental de sensibilização a alérgenos é a captação e processamento de alérgenos, internalizados por células dendríticas, situadas no epitélio e submucosas das vias aéreas (Von Garnier et al., 2005; Hammad & Lambrecht, 2006). Essa absorção do alérgeno é reforçada pela alta afinidade de receptores de IgE presentes nas células dendríticas que facilitam a internalização do alérgeno; de modo a fazer com que as células dendríticas da mucosa brônquica (atuando como antígenos) interajam com os linfócitos T; e assim, provocando os linfócitos B a produzirem IgE, a serem liberadas na circulação sanguínea para se unirem aos mastócitos; neste tipo de doença,

mastócitos ligam-se à Ig-E por meio de receptores Fc (proteína presente na superfície de células) presentes nestas células, o que, por sua vez, desencadeará um processo inflamatório (Kitamura et al., 2007).

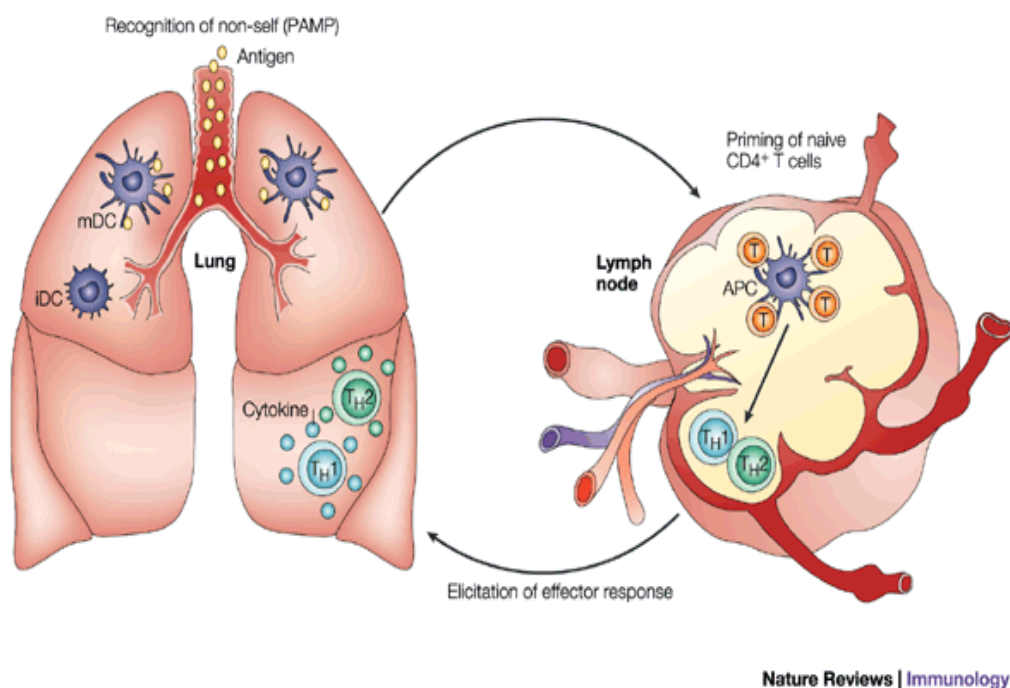


Figura 1: Reconhecimento do antígeno (Herrick & Bottomly K, 2003)

Subsequentemente à exposição dos mastócitos cobertos por IgE aos mesmo antígenos causa reação cruzada da IgE e liberação de mediadores químicos. Os mastócitos na superfície da mucosa respiratória são inicialmente ativados; o mediador resultante liberado abre as junções intracelulares da mucosa, permitindo a penetração dos antígenos em um número maior de mastócitos na mucosa (Herrick & Bottomly K, 2003; Von Garnier et al., 2005).

Após essa penetração o mastócitos continuam a liberar uma série de mediadores. A literatura traz com maior evidência os leucotrienos C₄, D₄ e E₄, mediadores extremamente potentes que causam uma broncoconstrição prolongada, aumentam a permeabilidade vascular e a secreção de mucina. O

leucotrieno B₄ (LTB₄) é um poderoso quimioatraente para eosinófilos e neutrófilos (White, 1999); a acetilcolina liberada pelos nervos motores pulmonares resulta em uma constrição muscular lisa das vias aéreas por estimulação direta dos receptores muscarínicos; a histamina que causa broncoespasmos e aumenta a permeabilidade vascular, entretanto não é considerada um mediador importante, já que drogas anti-histamínicas não causam nenhum benefício; prostaglandina D₂ que causa a broncoconstrição e a vasodilatação; e o fator de ativação de plaquetária que causa agregação de plaquetas e libera histamina presente em seus grânulos (Holgate, 2008).

Os mastócitos também liberam citocinas adicionais que causam o influxo de outros leucócitos, e têm a capacidade de recrutar células secundárias como macrófagos, basófilos e eosinófilos para o sítio inflamatório (Figura 2). Estas células inflamatórias iniciam a reação de fase tardia. Uma variedade de mediadores inflamatórios tem sido implicada na fase “aguda” ou “imediate”, embora suas relativas importâncias no ataque de asma variem enormemente. Das citocinas liberadas pelos mastócitos durante o processo inflamatório da asma destacam-se a IL-13 (Interleucina 13) que é quimioatraente de basófilos, a IL-4 (Interleucina 4) que estimula a formação e diferenciação de IgE; IL-5 (Interleucina 5) que atrai eosinófilos e basófilos, e estimula a proliferação e diferenciação de eosinófilos, e possivelmente retarda a apoptose de eosinófilos. Outras citocinas liberadas a partir dos mastócitos incluem o fator de necrose tumoral (TNF- α), fator estimulador de colônias de macrófagos (GM-CSF) (White, 1999; Bousquet et al., 2000).

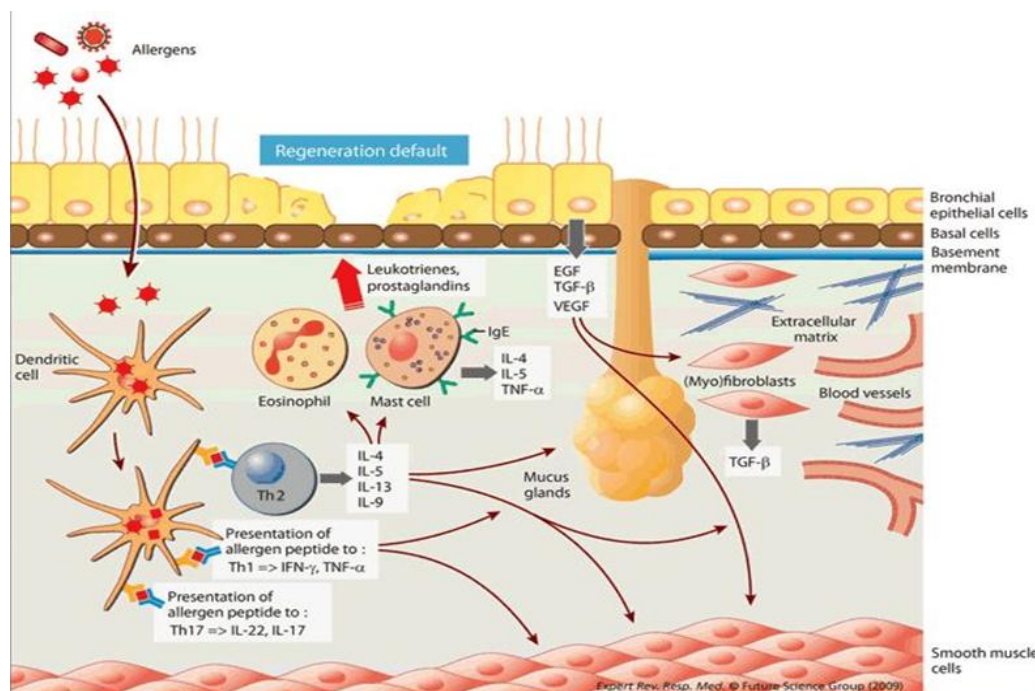


Figura 2: Mecanismos inflamatórios na asma (Sperini et al., 2009).

Vários estudos postulam que pelo menos na asma leve e moderada as células Th₂ dominem as vias aéreas, e que estes sejam cruciais para o desenvolvimento da inflamação observada na asma (Robinson, 1992; Vieira et al., 2007; Horner, 2010). Estudos demonstram que as células Th₂ estão presentes no pulmão de pacientes com asma, especialmente pacientes com asma alérgica. Nos últimos anos o foco tem sido tentar desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na alergenicidade e sensibilização a Th₂ (Robinson et al., 1992; Vieira et al., 2007; Horner, 2010).

Essas células são geradas nos linfonodos regionais e posteriormente recrutadas para as vias aéreas através de proteínas quimioatraentes de 8 a 10kDa produzidas por diferentes células presentes no pulmão dos indivíduos asmáticos. Essas proteínas, denominadas quimiocinas, e seus receptores específicos, orquestram a migração dos linfócitos para os diferentes tecidos

através do gradiente de quimiocinas presentes no local (James & Carroll, 2000).

Após a instalação do processo inflamatório característico da asma, ocorre a migração de células inflamatórias para o pulmão e vias aéreas. Uma vez que essas células são recrutadas para os pulmões causam o desenvolvimento de inflamação eosinofílica e aumento da responsividade das vias aéreas. Os eosinófilos desempenham um importante papel na asma alérgica, estes não estão presentes somente na parede das vias aéreas durante a asma não controlada, mas também são encontrados em grande número no escarro e fluido do lavado broncoalveolar (Kay, 2005; Lemiere, 2006). Embora seja difícil definir funcionalmente, do ponto de vista estrutural, existem evidências de que além da inflamação das vias aéreas, alterações nos elementos figurados dessas vias possam contribuir significativamente para a fisiopatologia da asma (James & Carroll, 2000).

1.3 Modelo Animal de Asma

A compreensão do papel das células Th₂ tem sido beneficiado pela utilização de modelos animais de asma alérgica. Camundongos podem ser sensibilizados com uma série de proteínas, como a (OVA) Ovalbumina; extrato de ácaros; *Aspergillus fumigatus* e pólen, sendo utilizados com adjuvantes como o alumínio ou baixas doses de endotoxina (ou sem adjuvantes no caso de alérgenos com endotoxina endógena ou com atividade de protease). Isso resulta em uma resposta Th₂ polarizada e uma produção de IgE específica ao alérgeno. Uma vez que a sensibilização tenha ocorrido, a administração

repetida de alérgeno leva ao desenvolvimento de características da asma alérgica humana, como por exemplo, inflamação eosinofílica das vias aéreas, secreção de muco, remodelação das vias aéreas (Cohn et al., 1997).

1.4 Fármacos para o tratamento da asma

O controle da asma inclui cinco passos, estes consistem num sistema de vigilância crescente onde a exacerbação da doença inclui a utilização de novos medicamentos de combate ao bronco espasmo e controle da inflamação, bem como o aumento nas dosagens dos medicamentos já utilizados ou substituição dos mesmos. A manutenção dos sinais e sintomas da doença por um período de pelo menos três meses, dá direito ao paciente regredir a utilização de medicamentos de combate para o passo anterior. Os medicamentos para o tratamento da asma incluem os agonistas β_2 seletivos, os glicocorticóides, os anticolinérgicos, os antagonistas de receptor de leucotrienos, as metilxantinas e, mais recentemente, o anticorpo monoclonal anti-IgE (Hoshino et al., 2009). Medicamentos esteróides para o tratamento de asma apresentam-se como objeto de intenso estudo nas últimas três décadas, seus mecanismos de ação, sua estrutura, regulação e receptores atualmente são muito mais compreendidos e pesquisados (Barnes, 2006). A utilização de corticosteróides figura como a principal classe de medicamentos empregada por seus benefícios antiinflamatórios para o tratamento da asma. Entretanto, além de uma parcela importante de pacientes asmáticos apresentar resistência adoção de corticóides como forma de tratamento da doença, um acentuado

grau de remodelamento está presente em indivíduos cuja causa de óbito foi a asma e faziam regularmente o uso destes medicamentos (Kay, 2005).

Ademais, mesmo os glicocorticóides modernos apresentam ainda efeitos colaterais relacionados à sua utilização crônica (Barnes, 2006). Assim, fica claro que os corticóides são a maneira mais efetiva de tratamento para pacientes asmáticos, entretanto seus efeitos adversos exigem esforços para se desenvolver esteróides com potenciais efeitos colaterais reduzidos e/ou identificação de substâncias capazes de substituí-los no tratamento dessa doença.

Nesse sentido, tem sido amplamente compreendida sobre a resposta inflamatória no pulmão, mas muitos detalhes moleculares ainda não são entendidos completamente. A resposta inflamatória no pulmão é um mecanismo pelo qual o corpo responde e se protege de eventos infecciosos e não infecciosos. No pulmão, o mecanismo pode ser inespecífico ou antígeno específico. A resposta inflamatória é geralmente protetora, mas tem potencial de lesões no tecido incluindo as vias aéreas e levar alterações crônicas e irreversíveis. Novas abordagens para a terapia baseiam-se em compreender fisiopatologia da asma e são dirigidas para bloquear a resposta inflamatória.

1.5 Canabinóides

A *Cannabis sativa* é uma planta dióica, pois tem espécimes masculinas e femininas. A planta masculina geralmente morre após polinizar a planta feminina. Outros nomes atribuídos aos produtos da *Cannabis* são marijuana, hashish, charas, bhang, ganja e sinsemila. Hashish (haxixe) e charas são os

nomes dados à resina seca extraída das flores de plantas fêmeas, que apresenta a maior porcentagem de compostos psicoativos (de 10 a 20 %). Os termos ganja e sinsemila são utilizados para definir o material seco encontrado no topo das plantas fêmeas, contendo cerca de 5 a 8 % de compostos psicoativos. Bhang e marijuana são preparações com menor conteúdo (2 a 5 %) de substâncias psicoativas extraídas do restante da planta (Honório et al., 2006).

A composição química da *Cannabis* tem sido estudada por muitos anos. Aproximadamente 500 compostos foram identificados na planta destacando-se: terpenos, açúcares, hidrocarbonetos, esteróides, flavonóides, compostos nitrogenados, aminoácidos, entre outros (Radwan et al., 2008). Entre os compostos presentes na *Cannabis*, ressaltam-se os canabinóides que são encontrados exclusivamente nesta planta. Os canabinóides são compostos terpenofenólicos com 21 átomos de carbono e representam a principal classe dentre os constituintes da *Cannabis*. Estes compostos são secretados pelos tricomas da planta. Esses tricomas são encontrados em partes específicas das inflorescências nas espécies masculina e feminina, sendo que esta região contém as maiores concentrações dos canabinóides, seguido pelas folhas. Menores quantidades são encontradas no caule e raiz e nenhuma nos frutos (De Backer et al., 2009).

Até o momento, 86 canabinóides foram isolados da *Cannabis* (Ahmed et al., 2008). O primeiro estudo sobre o isolamento, em forma pura, de um princípio ativo da *Cannabis*, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) foi reportado em 1964 por Gaoni e Mechoulam. Devido ao grande interesse nos efeitos causados pelos compostos extraídos da *Cannabis*, vários estudos têm sido

realizados com o objetivo de identificar possíveis relações entre a estrutura química e a atividade biológica apresentada por estes compostos. Na década de 70, vários canabinóides foram isolados e sintetizados e as principais rotas de síntese e biossíntese foram elucidadas (Brenneisen, 2007).

Os canabinóides são biossintetizados pelo metabolismo da planta na forma de ácidos carboxílicos. Os tipos mais comuns encontrados são o ácido Δ^9 -tetraidrocanabinólico A (THCA), ácido canabidiólico (CBDA) e o ácido canabigerólico (CBGA). O CBGA é o precursor direto do THCA, CBDA e o ácido canabinocrenólico (CBCA). Como o grupo carboxil é instável, este é facilmente perdido na forma de CO_2 , sob influência de luz, calor, estocagem prolongada ou quando a *Cannabis* é consumida, resultando em seus análogos neutros correspondentes: Δ^9 -THC, canabidiol (CBD) e canabigerol (CBG). A conversão mais importante é a transformação do THCA em Δ^9 -THC, o qual é o principal constituinte psicoativo presente na *Cannabis* (Thakur et al., 2005).

O CBD apresenta significativo efeito anticonvulsivante e sedativo, não sendo um componente psicoativo (Thakur et al., 2005). E já são descritos por exercer um potente efeito antiinflamatório, imunomodulador, e analgésico (Cunha et al., 1980, Thakur et al., 2005). Também têm sido demonstrados que seus efeitos como imunomodulador são bem tolerados quando administrado cronicamente em seres humanos (Pertwee, 2004). Além disso, a administração de CBD em um modelo animal da doença de Alzheimer demonstrou um aumento significativo na sobrevivência dos animais, supostamente por uma combinação de ações neuroprotetoras, antioxidantes e anti-apoptóticas (Iuvone et al., 2004). Devido aos seus efeitos benéficos em diversas patologias e sua baixa toxicidade em seres humanos e outras espécies (Rosenkrantz et al;

1981) e seu efeito psicoativo ser observado apenas por via intravenosa (Thakur et al., 2005) o CBD representa um candidato promissor ao tratamento de asma.

Nesse contexto, sabendo que a interação entre as células da resposta imune e o contato com antígenos representa um momento crucial da fisiopatologia de doenças inflamatórias e define a gravidade das manifestações clínicas e da própria sobrevida ou não do paciente, é de extrema importância um estudo dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório e o entendimento de seu equilíbrio com uma resposta imune adaptativa do indivíduo na busca de desenvolver novas estratégias terapêuticas para a asma. Nesse sentido, nosso propósito será, através do presente estudo, avaliar o efeito do tratamento com CBD em animais submetidos à modelo animal de asma.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito terapêutico de Canabidiol, em modelo animal de asma induzido por ovalbumina, sobre parâmetros inflamatórios.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os níveis das citocinas da imunidade natural: IL-6, IL-10 e TNF- α , em soro de animais submetidos ao modelo animal de asma induzido por ovalbumina e tratados com o Canabidiol;

Avaliar os níveis das citocinas da imunidade adquirida: IL-4, IL-13 e IL-5, em soro de animais submetidos ao modelo animal de asma induzido por ovalbumina e tratados com o Canabidiol.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Evaluation of serum cytokines levels and the role of cannabidiol in animal model of asthma

Francieli Vuolo, Fabricia Petronilho, Letícia Galant, João Quevedo, Jaime E.
Hallak, Antônio W. Zuardi, José A. Crippa, Flávio kapczinski,.Felipe Dal-Pizzol

Submetido a *European Respiratory Journal*

Evaluation of serum cytokines levels and the role of cannabidiol in animal model of asthma

Francieli Vuolo¹, Fabricia Petronilho^{1,2}, Letícia Galant¹, João Quevedo³, Jaime E. Hallak⁴, Antônio W. Zuardi⁵, José A. Crippa⁴, Flávio kapczinski⁶, Felipe Dal-Pizzol¹

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;

²Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil;

³ Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;

⁴Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil;

⁵Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil;

⁶Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Felipe Dal-Pizzol. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Fax: #55 48 3431-2539. E-mail address: piz@unesc.net.

Abstract

Asthma represents a public health problem and, traditionally is classified as an atypical, where contacting the allergen can initiate clinical signs like airway inflammation, bronchial hyperresponsiveness and reversible obstruction of airways. After installation of the inflammatory process characteristic of asthma, occurs the migration of inflammatory cells to the lung and airways. Studies have demonstrated presence of T-Helper 2 lymphocytes in the lung of patients with asthma, as known, these cells are involved in cytokine production that regulates immunoglobins synthesis like IgE. Knowing that interaction of immune system cells and allergen contact represents a crucial point in inflammatory diseases physiopathology, the aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory potential of cannabidiol (CBD) in this setting, because it's already known antiseizure, anti-inflammatory, sedative, immunomodulatory, analgesic and antioxidant effects. For this evaluation, we used 8 week old wistar rats, that were immunized with ovalbumin (OVA) (10mg/kg), 14 days after they were immunized again (OVA, 10mg/kg), after 7 days, animals were submitted to 30 minute nebulization, for 3 consecutive days using OVA 1%. Control group animals were immunized with 100 μ L aluminum hydroxide in the same days, and were submitted to nebulization only with saline. In the last 2 days of nebulization animals received intraperitoneally the CBD treatment, 5mg/kg, and after 24 hours of the last inhalation session, animals were decapitated and the blood was collected to cytokine analysis using serum. Levels of IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10 and TNF- α were determined, and the results achieved were significantly lower when CBD was used as treatment, compared to animals who only received saline as treatment, except for the IL-

10 levels. Against of the inflammatory exacerbation found during asthma, many studies believe in the modulation of cytokine activation as having therapeutic potential. CBD demonstrated being an promising substance to control inflammatory response on asthma.

Keywords: asthma, canabidiol, cytokines, inflammatory response, ovalbumin, serum.

Introduction

Atopic diseases, including dermatitis and asthma, sharing genetic and environmental risk factors, have prevalence increased in recent decades, and now affect approximately 20% of the population in the developed countries [1,2].

Asthma is a disorder of the conducting airways, which contract too much and too easily spontaneously and in response to a wide range of exogenous and endogenous stimuli. This airway hyperresponsiveness is accompanied by enhanced sensory irritability of airways and increased mucus secretion. The different clinical expressions of asthma involve varied environmental factor that interact with the airways to cause acute and chronic inflammation, the others factor that contribute to asthma is the smooth muscle contraction exacerbate, edema and remodeling of airways. Heterogeneity of asthma also to be relate to different therapies responses. Asthma is considered a good example of gene–environment interactions, although no single gene or environmental factor accounts by disease. This chapter focuses on the pathophysiologic events underlying the inflammatory and remodeling response [3].

Asthma is characterized by chronic airway inflammation and remodeling, hyperresponsiveness and increased of cytokines mediated by T-helper cell 2 levels (Th2) [3].

Cannabinoids are components of the *Cannabis sativa* (marijuana) plant and are known to exert potent anti-inflammatory, immunomodulatory, and analgesic effects through activation of cannabinoid-1 and -2 (CB1 and CB2) receptors located in the central nervous system (CNS) and immune cells,

respectively [4]. Additionally, was shown that cannabidiol orally administered was effective in reducing inflammation in a model of acute carrageenan-induced paw inflammation [5], and that anti-nociceptive effect was mediated by transient receptor potential vanilloid (TRPV1) receptor [6]. Moreover, it was shown that cannabidiol reduced not only acute but also chronic inflammatory responses [7].

The two most cannabinoids important are Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD), the latter being the main non-psychoactive cannabinoid and reported to have beneficial effects in many pathological conditions, including neuropsychiatric disorders [8] and brain inflammatory diseases, without having significant activity on CB1 and CB2 receptors. It has also been demonstrated that antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory effects are well tolerated without significant effects when chronically administered in humans [9]. Furthermore, the administration of CBD in an animal model of Alzheimer's disease (AD) significantly had elevated cell survival, probably by a combination of neuroprotective, antioxidant, and anti-apoptotic actions [10]. Because of beneficial effects in several pathologies and low toxicity in humans and other species [11], CBD represents a promising candidate to asthma treatment. In this regard, the present study to evaluate the effects of CBD administration in inflammatory parameters (assessed by cytokines levels) in serum in rats submitted to asthma model.

Materials and Methods

Animals

Male Adult Wistar rats (8 weeks old) were obtained from UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil) breeding colony. They were housed five per cage with food and water available ad libitum and were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, with the approval of Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Study design and treatment

The protocol was previously described with details to Zhou and collaborators. Rats were immunized i.p with 10 µg of chicken OVA in 100 µl of Alum hydroxide or Alum alone. After 14 days, rats were boosted with OVA or Alum. Seven days later, rats received aerosol challenges (30 min/for 3 d) with 1% OVA or saline [12].

CBD (THC-Pharm, Frankfurt, Germany, and STI-Pharm, UK) was suspended in 2% of polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80) in saline. The solutions were prepared immediately before use and were protected from light during the experimental session. To treatment, CBD was administered i.p. in the last two days nebulization at the doses of 5mg/kg [8], with either a single dose. All treatments were administered in a volume of 1 mL/kg of CBD diluted or vehicle. For this experiment we employed n=21 rats, that randomly divided

into three groups, as described below: Vehicle (control) (n=7); OVA + Vehicle (Asthma control) (n=7); OVA + CBD (Asthma + treatment) (n=7).

Serum Cytokine Assay

Cytokines IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10, TNF- α , in serum were assayed with the Luminex xMap™ Technology, briefly, the capture antibodies specific for each analyte are immobilized the microspheres through covalent bonds not reversible. After the analytic (sample) binds to the capture antibodies located on the surface of microspheres, the end detection is done via a third fluorescent marker, phycoerythrin (PE) connected to the detection antibody. The end result is a test sandwich through the microspheres.

Statistical analysis

All data are reported as mean \pm SEM. Statistical comparisons between experimental groups are using one-way ANOVA, post-hoc Newman-Keuls. All statistical analyzes were performed with the SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Differences are considered significant when $p < 0.05$.

Results

We determined the levels of 6 cytokines implicated in asthma, IL-4, IL-6, IL-13, IL-10, IL-5 and TNF- α , and our results demonstrate an increase in cytokine levels when the animals were subjected to induction protocol asthma,

when compared with the control group that received only vehicle, when we compare animals with asthma treated to vehicle to asthmatic animals treated to CBD we observed a significant reduction in these levels [Figures 1,2,3,4,5]. In opposition, the IL-10 levels, does not present significant increase if compared asthma to the control group, yet the CBD decreased these levels [Figure 6].

Discussion

Cannabidiol is a major non-psychoactive cannabinoid component of marijuana (*C. sativa*) [13]. Recently, has been shown to have potent immunosuppressive and anti-inflammatory properties. Therefore, we wondered whether cannabidiol would be effective to inflammatory parameters in a murine model of asthma induced by OVA to its potent anti-inflammatory property, as it has been reported in other models of inflammation [14].

Cytokines play a critical role in the development of several chronic diseases, including asthma. Multiple cytokines and chemokines have been implicated in pathophysiology of asthma [15] which leads to an intensive search for most specific therapies to disease, and inhibitors of cytokines and chemokines, become the key figures in novel therapeutic approach [16].

We observed, then, IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10 and TNF- α level, in animals submitted to animal model of asthma and treated com CBD. When the levels of cytokine IL-4 was observed, CBD treatment significantly reduced the levels compared to non-treated animals. IL-4 is responsible by inhibition of Th1 cells differentiation, Th2 cells differentiation and expansion and has an important role in IgE production. Some studies have shown a raise in the

expression of IL-4, in the proteic form and mRNA form, in patients with atypical and non-atypical asthma [17, 18]. IL-4 seems to be a requisite to T lymphocytes to begin the production of IL-5 [17-19]. Emphasizing the importance of IL-5 on asthma, it is essential to eosinophils maturation, and it accumulate on the lung during the inflammation process at the asthma [20]. In our analysis the IL-5 levels were lower in animals treated with CBD, which make us suppose that a decrease in eosinophilic inflammation may to happen during asthma treatment with CBD.

Mucus hypersecretion is an important characteristic in bronchial asthma, which contributes very much to the exacerbation of symptoms, and IL-13 is considered a stimulation factor for this raise [21]. In our experiments, IL-13 was also reduced with CBD administration, and we still can take in count that IL-13 and IL-4 have common receptors, what corroborate with studies which used an antagonist to this receptor (IL-4R- α), resulted in a prevention in the allergen induced response [22].

All these findings about cytokines involved in the asthma inflammatory response, IL-6 also stimulated thymocyte and T-Lymphocyte proliferation, increasing IgE by dependent IL-4 production, and mediating B cells differentiation. IL-6 levels are increased in sputum and systemic circulation in severe asthma patients, which can be responsible for the raise of C-reactive protein circulation in these patients [23]. In our findings, IL-6 levels also were reduced when CBD was used.

In order to investigate anti-inflammatory potential, when we evaluated an very important inflammatory mediator in severe asthma, TNF- α , who has been

used therapeutically via TNFRs soluble and antibodies against TNF- α [24, 25]. CBD also reduced the levels of TNF- α in the serum of animals submitted to asthma model.

When was measured the levels of IL-10, an antiinflammatory cytokine, we do not observed increase of it levels in animals submitted to asthma model compared to control levels. Some studies suggest that occurred a defect in the transcription and secretion of IL-10 by macrophages in asthma [26, 27], and this leads to decrease in release of antiinflammatory cytokines, thereby contributing to inflammation of the airways of asthmatic patient [28].

In conclusion, this study demonstrated that during the induction of asthma in an animal model induced by OVA, causes release of inflammatory cytokines involved in the disease. Then evaluated CBD reduce the inflammatory response as has been described perform this function. We then suggest that administration of CBD during exposure can reverse these cytokine levels by controlling the exaggerated inflammatory response and may be a therapeutic potential. Some recent hypotheses about antiinflammatory CBD effects have demonstrated that it action may be occur by inhibition to adenosine receptor in model of pulmonary inflammation [29] leading to increase in adenosine signalization [30] what can almost in part, explain this anti-inflammatory effect find in our results. Furthermore, a long search to discover the mechanism by which CBD exerts its potent antiinflammatory effect.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Laughter D, Istvan JA, Tofte SJ, Hanifin JM. The prevalence of atopic dermatitis in Oregon schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 649–655.
2. Ker J, Hartert TV. The atopic march: what's the evidence? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; 103: 282–289.
3. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:872-897.
4. Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 1980; 21: 175–185.
5. Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: 294–299.
6. Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 247–250.
7. Costa B, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2007; 556: 75–83.

8. Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, Guimarães FS. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 421–429.
9. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 2004; 153: 199 –215.
10. Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 2004; 89: 134–141.
11. Rosenkrantz H, Fleischman RW, Grant RJ. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 58: 118–131.
12. Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 2100-2105.
13. Zuardi AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr* 2008; 30: 271–280.
14. Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 11S–19S.
15. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 1998; 50:515–96.

16. Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:176–181.
17. Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB, Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1497-1504.
18. Kotsimbos TC, Ernst P, Hamid QA Interleukin-13 and interleukin-4 are coexpressed in atopic asthma. *Proc Assoc Am Physicians* 1996; 108:368-373.
19. Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Larché M, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1997; 158:3539-3544.
20. Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012; 4:68-79.
21. Digiovanni FA, Ellis R, Wattie J, Hirota JA, Southam DS, Inman MD. Concurrent dual allergen exposure and its effects on airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in mice. *Dis Model Mech* 2009; 2:275–282.
22. Wenzel S, Wilbraham D, Fuller R, Getz EB, Longphre M. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in

asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet* 2007;370:1422-1431.

23. Van Snick J. Interleukin-6:an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-278.

24. Erzurum SP. Inhibition of tumor necrosis factor α for refractory asthma. *N Engl J Med* 2006; 354: 754-758.

25. Schwingshacki A, Duszyk M, Bravn N, Moqbel R. Human eosinophis release matrix metalloproteinase-9 on stmulation with TNFalpha. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:983-989

26. Steinke JW, Payne SC, Borish L. Interleukin-4 in the Generation of the AERD Phenotype: Implications for Molecular Mechanisms Driving Therapeutic Benefit of Aspirin Desensitization. *J Allergy* 2012; 2012:182090.

27. John M, Lim S, Seybold J, Robichaud A, O'connor B, Barnes PJ, Chung KF. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1,GM-CSF and IFN- γ release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:256–262.

28. Calhoun WJ, Jarjour NN, Gleich GJ, Schwartz LB, Busse WW. Effect of nedocromil sodium pretreatment on the immediate and late responses of the airway to segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 46-50.

29. Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretti LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, Akamine AT, Almeida VI, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Hallak JE,Zuardi AW, Crippa JA, Palermo-Neto J. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute

lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol* 2012; 678: 78-85.

30. Izzo AA, Borelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 515-527.

Figure Legends

Figure 1: Effects of administration of CBD on cytokine levels IL-4 levels in serum. Bars represent means \pm SD of 7 rats. * $p < 0.05$ vs. Control Vehicle, # $p < 0.05$ vs. Asthma Control. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls.

Figure 2: Effects of administration of CBD on cytokine levels IL-5 in serum. Bars represent means \pm SD of 7 rats. * $p < 0.05$ vs. Control Vehicle, # $p < 0.05$ vs. Asthma Control. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls.

Figure 3: Effects of administration of CBD on cytokine levels IL-13 in serum. Bars represent means \pm SD of 7 rats. * $p < 0.05$ vs. Control Vehicle, # $p < 0.05$ vs. Asthma Control. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls.

Figure 4: Effects of administration of CBD on cytokine levels IL-6 in serum. Bars represent means \pm SD of 7 rats. * $p < 0.05$ vs. Control Vehicle, # $p < 0.05$ vs. Asthma Control. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls.

Figure 5: Effects of administration of CBD on cytokine levels TNF- α in serum. Bars represent means \pm SD of 7 rats. * $p < 0.05$ vs. Control Vehicle, # $p < 0.05$ vs. Asthma Control. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls

Figure 6: Effects of administration of CBD on cytokine levels IL-10 in serum. Bars represent means \pm SD of 7 rats. * $p < 0.05$ vs. Control Vehicle, # $p < 0.05$ vs. Asthma Control. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls.

Figures

Figure 1

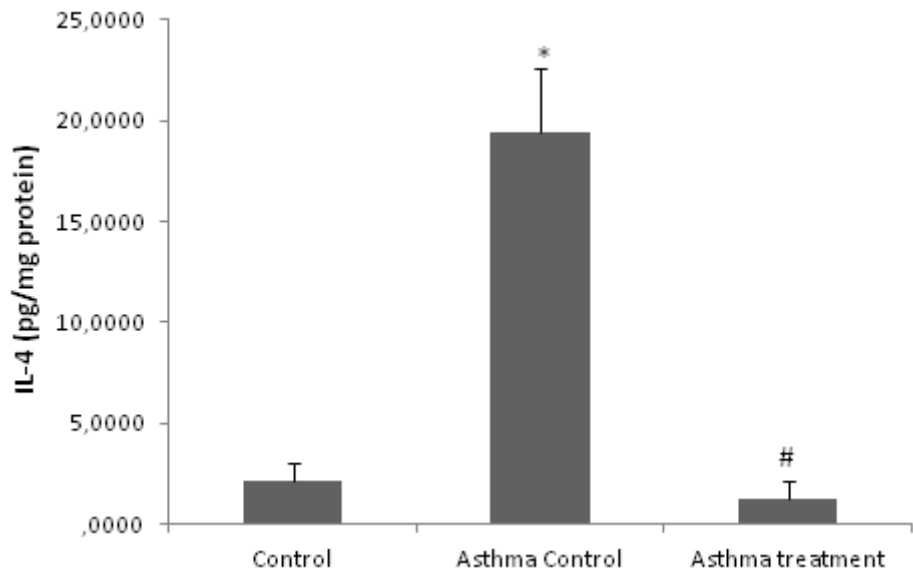


Figure 2

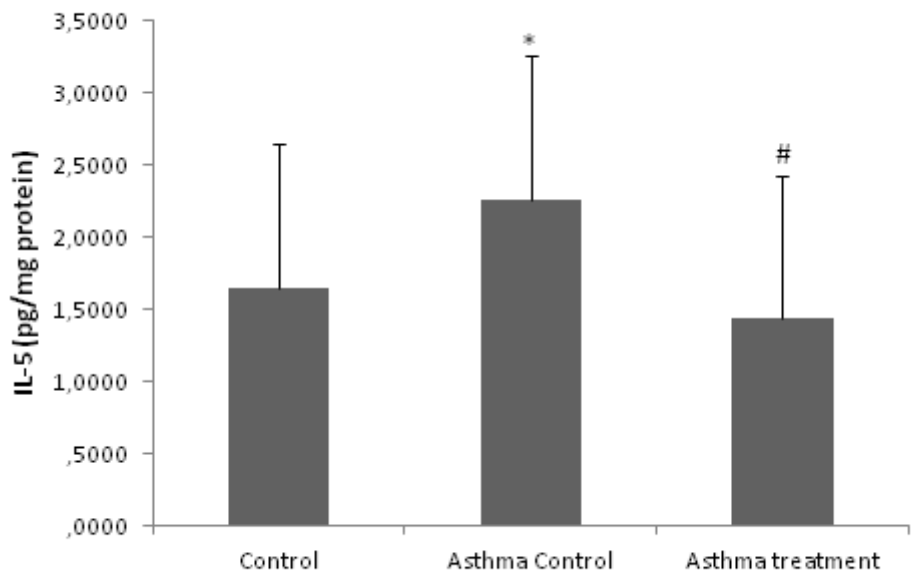


Figure 3

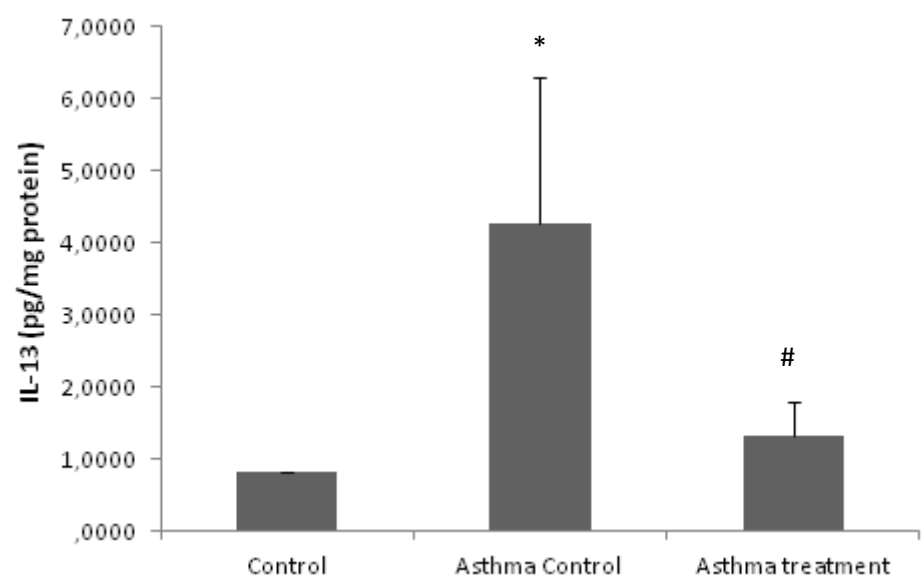


Figure 4

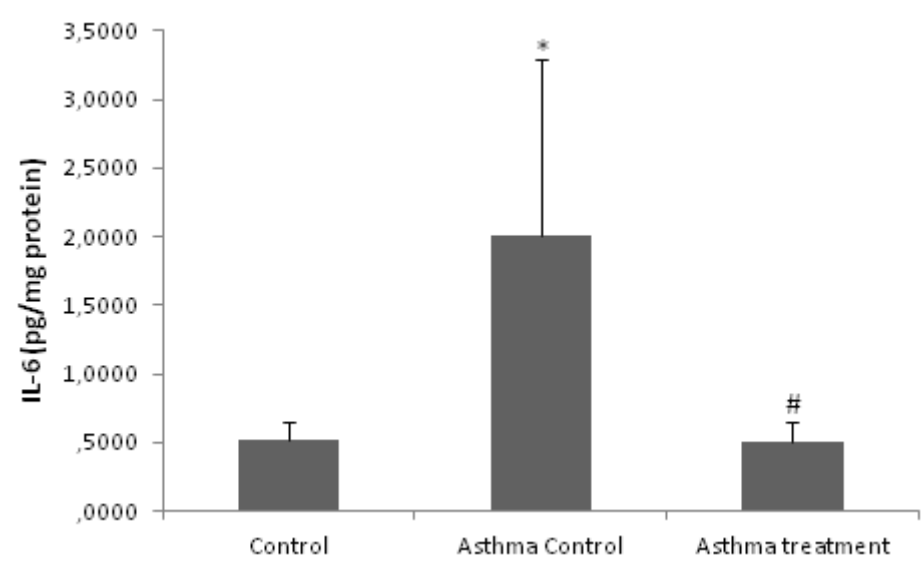


Figure 5

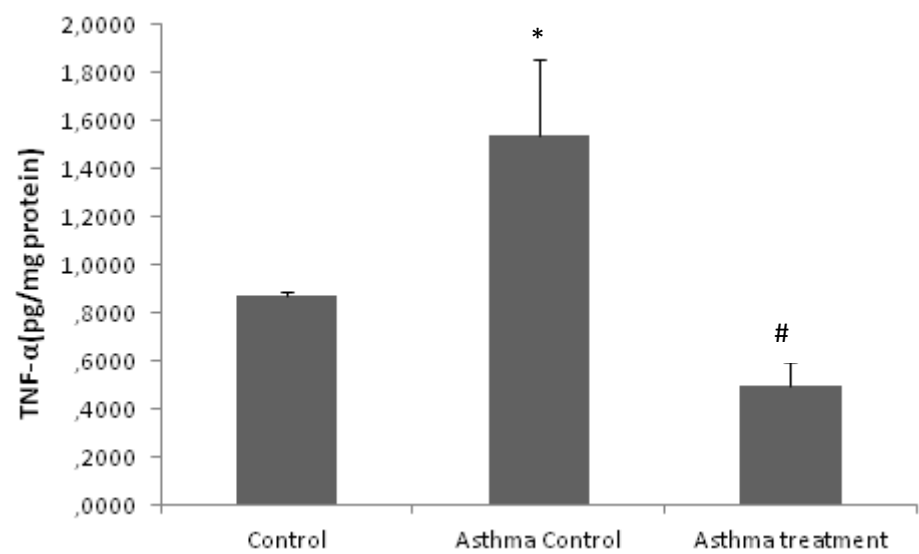
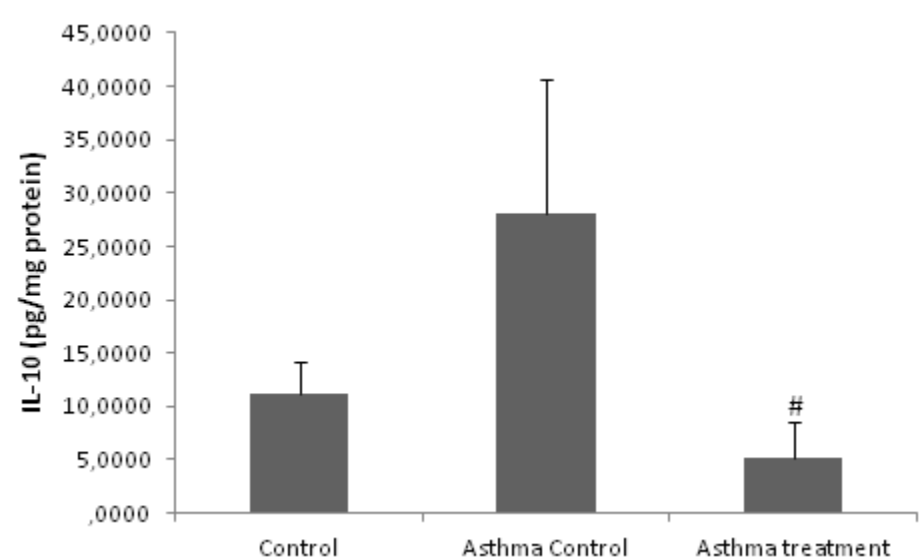


Figure 6



Discussão

As citocinas desempenham um papel crítico no desenvolvimento da inflamação crônica em diversas doenças, incluindo a asma (Chung & Barnes, 1999) o que leva a uma busca intensiva para terapias mais específicas à doença, e inibidores de citocinas e quimiocinas, tornam-se figuras chaves nessa nova abordagem terapêutica (Barnes, 2000).

Existem várias abordagens possíveis para inibir citocinas específicas (Barnes, 1999; Barnes, 2000). Como a inibição da síntese de citocinas (glicocorticoides, ciclosporina A, tacrolimos, inibidores seletivos para Th₂), anticorpos bloqueadores para citocinas ou seus receptores, antagonistas de receptores solúveis, ou drogas que bloqueiam a transdução de sinal de vias ativadas por citocinas (Barnes, 1999). Os linfócitos Th₂ desempenham um papel chave na resposta eosinofílica durante a resposta inflamatória na asma, o que sugere que o bloqueio ou efeito destas citocinas possam ter um potencial terapêutico (Barnes, 2000).

Assim, buscamos verificar o efeito da administração do CBD que possui importante papel na modulação da resposta inflamatória em modelo animal de asma, onde os animais foram sensibilizados através da exposição à OVA.

A ativação de linfócitos T após a provocação com alérgeno causa a secreção de citocinas Th₂, como IL-4, IL-5 e IL-13, o que pode ser um mecanismo importante para a resposta tardia. A fase tardia é considerada um modelo de estudo dos mecanismos da inflamação crônica da asma (Bousquet et al., 2000). Célula T, IgE e citocinas IL-4 e IL5 tem papel fundamental no

início e sustentação da resposta em asmáticos por regular o recrutamento e/ou ativação de mastócitos e eosinófilos na via aérea (Foster et al., 1997).

Antes que a resposta Th₂ seja iniciada, linfócitos T CD4⁺ auxiliares (em inglês *helper*) se subdividem em duas categorias fenotípicas, Th₁ e Th₂, e o fator determinante para essa diferenciação pode estar relacionado à ação das citocinas do ambiente circulante do linfócito. A IL-4 apresenta esse tipo de característica, proveniente de mastócitos, basófilos, células natural killer como já mencionado, estimulando linfócitos a desenvolverem um padrão Th₂ com expressão de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, e IL-25. Quando mensuramos os níveis de IL-4 em animais submetidos à exposição de OVA e tratados com o CBD, esses valores foram diminuídos (Figura 1), essa diminuição pode estar envolvida na diminuição da liberação de outras citocinas presentes na resposta inflamatória na asma.

Estudos realizados através de biópsia brônquica evidenciaram ao nível do epitélio e subepitélio, o aumento na expressão da IL-4, tanto sob a forma proteica como sob a forma de mRNA, em pacientes com asma atópica e não-atópica, o que não foi demonstrado em controles não-asmáticos (Humbert et al., 1996; Kotsimbos et al., 1996; Ying et al., 1997). A IL-4 parece ser um pré-requisito para que os linfócitos T iniciem a produção de IL-5. (Humbert et al., 1996; Kotsimbos et al., 1996; Ying et al., 1997).

Existe uma forte evidência do papel da IL-5 na asma, por ser essencial no mecanismo de maturação do precursor de eosinófilos na medula óssea, e estes eosinófilos se acumulam no pulmão durante um processo inflamatório pulmonar (Tae, et al., 2012).

A asma brônquica é caracterizada por uma inflamação eosinofílica da mucosa brônquica. A IL-5 está implicada principalmente no desenvolvimento desta inflamação porque promove o crescimento, maturação, migração, infiltração local, ativação e sobrevivência dos eosinófilos. Além de ser a citocina predominante em lavado broncoalveolar obtido de pacientes com asma. A concentração de IL-5 em soro de pacientes com asma sintomática é diminuída com terapia de corticoides orais (Egan et al., 1996; Lalani et al., 1999). Assim um interesse particular tem sido dado ao estudo da IL-5 devido a sua eminente importância no controle da função de eosinófilos. Experimentos *in vitro*, tem demonstrado que a IL-5, aumenta a adesão do eosinófilo na célula epitelial, aumenta o número de eosinófilos remanescentes, estimula eosinopoiese e aumenta a atividade citotóxica do eosinófilo (Egan et al., 1997).

Assim, quando administramos o CBD como tratamento em animais submetidos ao modelo de asma, podemos observar uma diminuição significativa nos níveis de IL-5 (Figura 2), este se demonstra um potencial terapêutico para tal inflamação exacerbada; estudos ainda enfatizam que a inibição da IL-5 mostrou um bloqueio do precursor de eosinófilos e remove posteriormente uma das maiores causas da asma (Egan et al., 1997). Recentemente, eosinófilos tem sido referido na síntese e armazenamento de uma série de proteínas reguladoras em seus grânulos secretores (eosinas). Estes mediadores são citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Lacy & Mogbel, 1997). Acredita-se então, que os eosinófilos têm um importante papel nas respostas inflamatórias das vias aéreas, e a eosinofília do tecido é uma característica da via aérea de asmáticos, portanto, os eosinófilos têm sido

demonstrados como causadores da injúria da mucosa e provavelmente contribuem para alterações fisiológicas do pulmão.

A IL-13 ainda é considerada o fator estimulante da hipersecreção de muco na asma (Park et al., 2009), essa hipersecreção de muco é uma característica importante na asma brônquica, contribuindo para exacerbação da doença (DiGiovanni et al., 2009). E em nosso estudo, quando analisamos a citocina IL-13 que se liga IL-4R α , um receptor comum para IL-13 e IL-4, podemos perceber a mesma diminuição em seus níveis (Figura 3), isso vem de encontro a estudos que usaram um antagonista do receptor IL-4R α , resultando em uma prevenção significativa na resposta induzida pelo alérgeno (Wenzel et al., 2007), reforçando ainda a importância da IL-13 no processo fisiopatológico da asma o tratamento com anti-IL-13 melhorou as pontuações pulmonares em paciente com asma (Corren et al., 2011). O bloqueio da IL-13 em camundongos preveniu o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas, produção de muco, e inflamação das vias aéreas, durante a indução de asma (Wills-Karp et al., 1998), reforçando a importância da IL-13, sua sobre-expressão foi suficiente para aumentar a hiperresponsividade e metaplasia de muco, um aumento na produção de quimiocinas e inflamação das vias aéreas (Zhu et al., 1999; Kuperman et al., 2002).

Vindo ao encontro de todos esses achados de citocinas envolvidas na resposta inflamatória na asma, a IL-6 ainda estimula a proliferação de timócitos e linfócitos T, aumentando a produção de IgE dependente da IL-4, e mediando a diferenciação de células B. Níveis de IL-6 estão aumentados no escarro e na circulação sistêmica de pacientes com asma severa, esta pode ser uma das

responsáveis pelo aumento dos níveis circulantes de proteína C reativa nestes pacientes (Van Snick, 1990). E os níveis de IL-6 também estiveram diminuídos quando administramos CDB nos animais (Figura 4). Seguindo ainda um perfil pró-inflamatório, existem também vários estudos, que sugerem que o TNF- α se constitua em um importante mediador inflamatório na asma severa. Duas modalidades terapêuticas utilizam esta nova via, utilizando os TNFRs solúveis recombinantes e anticorpos monoclonais contra o TNF- α . Os TNFRs solúveis recombinantes mimetizam a atividade dos TNFRs naturais e quando de sua ligação com o TNF previnem a interação com o TNFR da membrana celular (Schawingshackl et al., 1999; Erzurum, 2006). E podemos observar em nossos resultados que o CBD teve o perfil de diminuir a liberação de TNF- α em ratos submetidos ao modelo de asma, reforçando seu perfil antiinflamatório (Figura, 5).

Em contrapartida, quando observamos os níveis da citocina IL-10, um citocina com papel antiinflamatório, podemos concluir que não houve um aumento significativo nos animais submetidos ao modelo de asma em comparação ao controle (Fig. 6), isso se deve ao fato de que a IL-10 é um fator inibidor de citocinas com ação inibitória sobre a inflamação. A IL-10 é produzida pelos linfócitos Th₁ e Th₂ (Yssel et al., 1992; Del Prete et al., 1993) e IL-10 atua inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por fagócitos mononucleares, células natural killer e linfócitos Th₂. Na verdade, alguns trabalhos sugerem um defeito na transcrição e secreção de IL-10 pelos macrófagos durante a asma (Borish et al., 1996; Calhoun et al., 1996; John et al., 1998) e isso leve a uma menor liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo dessa forma para a inflamação das vias aéreas do paciente (Calhoun et al., 1996).

Quando avaliamos essas citocinas envolvidas na resposta inflamatória na asma e observamos a diminuição que o CBD provocou, reforçando seu efeito antiinflamatório trabalhos mostram que este provocou uma diminuição na migração de leucócitos para os pulmões (Ribeiro et al., 2012), visto que a migração de leucócitos para o local da inflamação é extremamente importante na lesão tecidual. Além disso, os neutrófilos são altamente especializados em suas funções primárias, que são a fagocitose e destruição de microrganismos (Klebannof, 2005), Ribeiro e colaboradores também mostraram no mesmo estudo que o CBD diminui a atividade da mieloperoxidase, e a produção de quimiocinas, como a MCP-1 e MCP-2 no modelo de lesão pulmonar aguda induzido pela administração de LPS (Ribeiro et. al., 2012)

Na busca de desvendar qual o mecanismo que leva o CBD exercer este potente efeito antiinflamatório, muito vem se especulando a respeito. Cunha e colaboradores (1980) mencionaram a possível ativação dos receptores canabinóides (CB1 e CB2) localizados no SNC e células imunes para explicar seu efeito como antiinflamatório e analgésico (Cunha et al., 1980). Contudo, recentemente pesquisadores usaram um inibidor do receptor de adenosina A_{2A} , no modelo de inflamação pulmonar, e observaram um possível envolvimento na potencialização do efeito de CBD inibindo tal receptor (Ribeiro et al., 2012); o CBD possui um amplo espectro de ações farmacológicas (Mechoulam et al., 2002; Zuardi, 2008), incluindo a inibição de um transportador de nucleosídeo, que por sua vez conduz ao aumento de adenosina extracelular (Carrier et al., 2006). Izzo e colaboradores acreditam que o aumento na sinalização de adenosina possa ser o principal mecanismo pelo que o CBD diminui a inflamação (Izzo et al., 2009).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que durante a indução de asma através do modelo animal induzido por OVA, provoca a liberação de citocinas envolvidas na resposta inflamatória dessa doença. Avaliamos então se o CBD diminuiria essa resposta inflamatória como tem sido descrito exercer tal função. Sugerimos então que a administração do CBD durante a exposição pode reverter tais níveis de citocinas, controlando essa resposta inflamatória exacerbada, podendo assim ser um potencial terapêutico. Ainda assim, a uma longa busca em descobrir por qual mecanismo o CBD exerce seu potente efeito antiinflamatório.

Referências

- ABBAS AK; LICHTMAN AH; PILLAI S. Hipersensibilidade tardia. In: *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: **Elsevier**. 2007.
- AHMED SA; ROSS SA; SLADE D; RADWAN MM; ZULFIQAR F; ELSOHLI M. A. Cannabinoid Ester Constituents from High-Potency *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**. 71: 536–542. 2008.
- BALZAR S; WENZEL SE; CHU HW. Transbrochial biopsy as tool to evaluate small airways in asthma. **The European Respiratory Journal**. 20: 254-59. 2002.
- BARNES PJ. Corticosteroids: the drug to beat. **European Journal Pharmacology**. 533: 2-14. 2006.
- BARNES PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**. 161: S176–181. 2000.
- Barnes PJ. Therapeutic strategies for allergic diseases. **Nature**. 402: B31–38. 1999
- BEASLEY R; PEKKANEN J; PEARCE N. Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized? **Pediatric Pulmonology**. 23: 149–150. 2001.
- BORISH L; AARONS A; RUMBYRT J; CVIETUSA P; NEGRI J; WENZEL S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. J. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**. 97: 1288–1296. 1996.

- BOUSQUET J; JEFFERY PK; BUSSE WW; JAHNSON M; VIGNOLA AM.
Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine.** 161: 1720-1745. 2000.
- BRENNEISEN R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other
British Thoracic Society Guidelines for the management of asthma: a
summary. **British Medical Journal.** 306: 776-782. 1993.
- CALHOUN WJ; JARJOUR NN; GLEICH GJ; SCHWARTZ LB; BUSSE WW.
Effect of nedocromil sodium pretreatment on the immediate and late
responses of the airway to segmental antigen challenge. **The Journal
of Allergy Clinical Immunology.** 50: 64-66. 1996.
- CARRIER EJ; AUCHAMPACH JA; HILLARD CJ. Inhibition of an equilibrative
nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid
immunosuppression. **Proceedings of the National Academy of
Science of the United States American.** 103: 7895–7900. 2006.
- CHUNG KF; BARNES PJ. Cytokines in asthma. **Thorax.** 54:825–57, 1999.
- COHN L; HOMER RJ; MARINOV A; RANKIN J; BOTTOMLY K. Induction of
airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for
interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. **The Journal
of Experimental Medicine.** 186: 1737–1747. 1997.
- CORREN J; LEMANSKE RF; HANANIA NA; KORENBLAT PE; PARSEY MV;
ARRON JR; HARRIS JM; SCHEERENS H; WU LC; SU Z; MOSESOVA
S. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. **The New England
Journal of Medicine.** 365: 1088-1098. 2011.

- CUNHA JM; CARLINI EA; PEREIRA AE; RAMOS OL; PIMENTEL C; GAGLIARDI R; SANVITO WL; LANDER N; MECHOULAM R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**. 21: 175–185. 1980.
- DATASUS [Homepage Internet]. Ministerio Da Saúde - Br. Accessed 10/03/2012, At Wwww.Datasus.Gov.Br.
- DE BACKER B; DEBRUS B; LEBRUN P; THEUNIS L; DUBOIS N; DECOCK L; VERSTRAETE A; HUBERT P; CHARLIER C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. **Journal of Chromatography B**. 877: 4115–4124. 2009.
- DEL PRETE G; DE CARLI M; ALMERIGOGNA F; GIUDIZI MG; BIAGIOTTI R; ROMAGNANI S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **Journal of Immunology**. 15: 353-360. 1993.
- DIGIOVANNI FA; ELLIS R; WATTIE J; HIROTA JA; SOUTHAM DS; INMAN MD. Concurrent dual allergen exposure and its effects on airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in mice. **Disease Models & Mechanisms**. 2: 275–282. 2009.
- DJUKANNOVIC R; ROCHE WR; WILSON JW; BLEASLEY CR; TWENTYMAN OP; HOWARTH RH; HOLGATE ST. Mucosal inflammation in asthma. **The American Review of Respiratory Disease**. 142: 434-457. 1990.

- EAGAN RW; UMLAND SP; CUSS FM; CHAPMAN RW. Biology of interleukin-5 and its relevance to allergic disease. **Allergy**. 51:71-81. 1996.
- EGAN RW; ATHWAHL D; CHOU CC; CHAPMAN RW; EMTAGE S; JENH CH; KUNG TT; MAUSER PJ; MURGOLO NJ; BODMER MW. Pulmonary biology of anti-interleukin 5 antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2: 69-73. 1997.
- ERZURUM SP. Inhibition of tumor necrosis factor α for refractory asthma. **The New England Journal of Medicine**. 354: 754. 2006.
- FOSTER PS; HOGAN SP; MATTHAEI KI; YOUNG IG. Interleukin-4 and interleukin-5 as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation and allergic airways hyperreactivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2: 55-61. 1997.
- GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed 2006. United Kingdom. Accessed March 2, 2012 [Available at [http www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)].
- HAMMAD H; LAMBRECHT BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**. 118. 331–336. 2006.
- HARGREAVE FE; NAIR P. The definition and diagnosis of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. 39: 1652-1658. 2009.
- HERRICK CA, BOTTOMLY K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. **Nature Reviews Immunology**. 3: 405-412. 2003.
- HOLGATE ST. Pathogenesis of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. 38: 872-897. 2008.

- HONÓRIO KM; ARROIO A; DA SILVA AF. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química Nova**. 2: 318-325. 2006.
- HORNER AA. Regulation of aeroallergen immunity by the innate immune system: laboratory evidence for a new paradigm. **Journal of Innate Immunology**. 2: 107-113. 2010.
- HOSHINO T; TODA R; AIZAWA H. Pharmacological treatment in Asthma and COPD. **Allergology international: of the Japanese Society of Allergology**. 58: 341-346. 2009.
- HUMBERT M; DURHAM SR; YING S; KIMMITT P; BARKANS J; ASSOULI B; PFISTER R; MENZ G; ROBINSON DS; KAY AB; CORRIGAN CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. **America Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 154:1497-504. 1996.
- IUVONE T; ESPOSITO G; ESPOSITO R; SANTAMARIA R; DI ROSA M; IZZO AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. **Jounal Neurochemistry**. 89: 134–141. 2004.
- IZZO AA; BORRELLI F; CAPASSO R; DI MARZO V; MECHOULAM R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences**. 30: 515–527. 2009.

- JAMES A. & CARROLL N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. The **European Respiratory Journal**. 15: 782–9. 2000.
- JARDIM JR. Pharmacological Economics And Asthma Treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 33: 4-6. 2007.
- JOHN M; LIM S, SEYBOLD J; ROBICHAUD A,O'CONNOR B; BARNES PJ; CHUNG KF. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1 α ,GM-CSF and IFN- γ release from alveolar macrophages in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 157: 256–262. 1998.
- KAY AB. The role play of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Trends in Molecular Medicine**. 11: 148-152. 2005.
- KITAMURA K; TAKEDA K; KOYA T; MIYAHARA N; KODAMA T; DAKHAMA A; TAKAI T; HIRANO A; TANIMOTO M; HARADA M; GELFAND EW. Critical role of the Fc receptor γ -chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. **Journal of Immunology**. 178: 480–488. 2007.
- KLEBANOFF SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leucocyte biology**. 77: 598-625. 2005.
- KOTSIMBOS TC; ERNST P; HAMID QA. Interleukin-13 and interleukin-4 are coexpressed in atopic asthma. **Proceedings of the Association Physicians**. 108: 368-373.
- KUPERMAN DA; HUANG X; KOTH LL; CHANG GH; DOLGANOV GM; ZHU Z; ELIAS JA; SHEPPARD D; ERLE DJ. Direct effects of interleukin-13 on

- epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. **Nature Medicine**. 8: 885-889. 2002.
- LACY P; MOQBEL R. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 92: 125-133. 1997.
- LAITINEN LA; LAITINEN A; HAAHTELA T. Airflow mucosal inflammation even in patients whith newly diagnosed asthma. **The American Review of Respiratory Disease**. 147: 697-704. 1993.
- LALANI T; SIMONS RK; AHMED AR. Biology of IL-5 in health and disease. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. 82:317-332, 1999.
- LANCAS T; KASAHARA DI; PRADO CM; TIBERIO IF; MARTINS MA; DOLHNIKOFF M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. **Journal of Applied Physiology**. 100: 1610-1616. 2006.
- LEMIERE C; ERNST P; OLIVENSTEIN R; YAMAUCHI Y; GOVINDARAJU K; LUDWIG MS; MARTIN JG; HAMID Q. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**. 118: 1033–9. 2006.
- MECHOULAM R; PARKER LA; GALLILY R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. **Journal of Clinical Pharmacology**. 42: 11S–19S. 2002.
- PARK SW; VERHAEGHE C; NGUYENVU LT; BARBEAU R; EISLEY CJ; NAKAGAMI Y; HUANG X; WOODRUFF PG; FAHY JV; ERLE DJ. Distinct roles of FOXA2 and FOXA3 in allergic airway disease and

- asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** 180: 603–610. 2009.
- PERTWEE RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology.** 153: 199 –215; 2004.
- PONTE E; FRANCO RA; SOUZA-MACHADO C; CRUZ AA. Impacto De Um Programa Para O Controle Da Asma Grave Na Utilização De Recursos Do Sistema Único De Saúde **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** 33: 15-9. 2007.
- RADWAN MM; ELSOHLI MA; SLADE D; AHMED SA; WILSON L; EL-ALFY AT; KHAN IA; ROSS SA. Non-cannabinoid constituents from a high potency *Cannabis sativa* variety. **Phytochemistry.** 69: 2627–2633. 2008.
- RIBEIRO A; FERRAZ-DE-PAULA V; PINHEIRO ML; VITORETTI LB; MARIANO-SOUZA DP; QUINTEIRO-FILHO WM; AKAMINE AT; ALMEIDA VI; QUEVEDO J; DAL-PIZZOL F; HALLAK JE; ZUARDI AW; CRIPPA JA; PALERMO-NETO J. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A (2A) receptor. **European Journal of Pharmacology.** 5: 67878-67885. 2012.
- ROBBINS; KUMAR, VINAY Patologia básica - 8. ed. / 2008 - Livros - patologia básica. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier.** 2008.

- ROBINSON DS; HAMID Q; YING S; TSICOPOULOS A; BARKANS J; BENTLEY AM; CORRIGAN C; DURHAM SR; KAY AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **The New England Journal of Medicine**. 326: 298–304. 1992.
- ROSENKRANTZ H; FLEISCHMAN RW; GRANT RJ. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 58: 118–131. 1981.
- SCHWINGSHACKI A; DUSZYK M; BRAVN N; MOQBEL R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNFalpha. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**. 104: 983. 1999.
- SERRA-BATLLES J; PLAZA V; MOREJON E; COMELLA A; BRUGUES J. Costs Of Asthma According To The Degree Of Severity. **The European Respiratory Journal**. 12: 1322-6. 1998.
- SINGH B; SHINAGAWA K; TAUBE C; GELFAND EW; PABST R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**. 141: 223-229. 2005.
- SOLÉ D; WANDALSEN GF; CAMELO-NUNES IC; NASPITZ CK; ISAAC - Brazilian Group. Prevalence Of Symptoms Of Asthma, Rhinitis, And Atopic Eczema Among Brazilian Children And Adolescents Identified By The International Study Of Asthma And Allergies In Childhood (Isaac) - Phase 3. **Jornal de Pediatria**. 82: 341-346. 2006.

SPERTINI F; REYMOND C; LEIMGRUBER A. Allergen specific immunotherapy of allergy and asthma: current and future trends. **Expert Review of Respiratory Medicine.** 3: 37-51. 2009.

STUMBLES PA; THOMAS JÁ; PIMM CL; LEE PT; VENAILLE TJ; PROKSCH S; HOLT PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. **The Journal of Experimental Medicine.** 188: 2019-2031. 1998.

SUR S; WILD JS; CHOUDHURY BK; SUR N; ALAM R; KLINMAN DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse of asthma by CpG Oligodeoxynucleotides. **Journal of Immunology.** 162: 6284-93. 1999.

TAE YM; PARK HT; MOON HG; KIM YS; JEON SG; ROH TY; BAE YS; GHO YS; RYU SH; KWON HS; KIM YK. Airway activation of formyl peptide receptors inhibits Th1 and Th17 cell responses via inhibition of mediator release from immune and inflammatory cells and maturation of dendritic cells. **Journal of Immunology.** 15: 1799-1808. 2012.

THAKUR GA; DUCLOS JR RI; MAKRIYANNIS A. Natural cannabinoids: Templates for drug discovery. **Life Science.** 78: 454-466. 2005.

TULIC MK; HAMID Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target. Roger S. Michell lecture. **Chest.** 123: 348-355. 2003.

VAN SNICK J. Interleukin-6:an overview. **Annual Review of Immunology.** 8: 253. 1990.

VIEIRA RP. Efeitos de treinamento físico e aeróbico sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camudongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2007.

VIEIRA RP; CLAUDINO RC; DUARTE AC; SANTOS AB; PERINI A; FARIA NETO HC; MAUAD T; MARTINS MA; DOLHNIKOFF M; CARVALHO CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. 176: 871-877. 2007.

VON GARNIER C; FILGUEIRA L; WIKSTROM M. SMITH M; THOMAS JA; STRICKLAND DH; HOLT PG; STUMBLES PA. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. **Journal of Immunology**. 175: 1609–1618. 2005.

WARMAN KL; SILVER EJ; STEIN RE. Asthma symptoms, morbidity, and anti-inflammatory use in inner city children. **Pediatrics**. 108: 277-282. 2001.

WENZEL S; WILBRAHAM D; FULLER R; GETZ EB; LONGPHRE M. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. **Lancet**. 370: 1422-1431. 2007.

WHITE M. Mediators of idammation and the inflammation process. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 103: 378-381. 1999.

WILLS-KARP M; LUYIMBAZI J; XU X; SCHOFIELD B; NEBEN TY; KARP CL; DONALDSON DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**. 282: 2258-2261. 1998.

XISTO DG; FARIAS LL; FERREIRA HC; PINCANÇO MR; AMITRANO D; LAPA SILVA JR; NEGRI EM; MAUAD T; CAMIELI D; SILVA LFF; CAPELOZZI VL; FAFTE DS; ZIN WA; ROCCO PRM. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine.** 171: 829-837. 2005.

YING S; ROBINSON DS; MENG Q; ROTTMAN J; KENNEDY R; RINGLER DJ; MACKAY CR; DAUGHERTY BL; SPRINGER MS; DURHAM SR; WILLIAMS TJ; KAY AB. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. **European Journal of Immunology.** 27: 3507-3516.

YSEL H; DE WAAL MALEFYT R; RONCAROLO MG; ABRAMS JS; LAHESMAA R; SPITS H; DE VRIES JE. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. **Journal of Immunology.** 1: 23778-2384. 1992.

ZHU Z HOMER RJ, WANG Z, CHEN Q, GEBB GP, WANG J, ZHANG Y, ELIAS JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **The Journal of Clinical Investigation.** 103: 779-88. 1999.

ZUARDI AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** 30: 271–280. 2008.